



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 03 873.9
Anmeldetag: 30. Januar 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Neue für das otsA-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen
IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das otsA-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu 30 mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b),

5 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.

10 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder
- 15 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb der Degeneriertheit des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- 20 (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptids nicht verändern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

25 a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 601

b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 602 und 1423

- 5 c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1424 und 1964

Weitere Gegenstände sind:

10 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

15 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das otsA-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

20 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
25 einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

30 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die

für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des otsA-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40 oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz

besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder einem daraus hergestellten Fragmentes.

5 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase
10 und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte
15 Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das otsA-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere
20 ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.
25

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das

entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- 20 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

- und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme
- 25

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
- Brevibacterium flavum* FERM-P 1708
- Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712
- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463
- 30 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464
- Corynebacterium glutamicum* DM58-1
- Corynebacterium glutamicum* DG52-5

Corynebacterium glutamicum DSM5715 und
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das Enzym Trehalose-6-Phosphat-Synthase (EC
Nr. 2.4.1.15) kodierende *otsA*-Gen von *C. glutamicum* wurde
5 isoliert.

Zur Isolierung des *otsA*-Gens oder auch anderer Gene von *C.*
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das
Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
10 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
20 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHC79 (Hohn und
Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life
30 Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982,
Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich
besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und
rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm
DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the National

Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das otsA-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des otsA-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen

werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten
10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1
15 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
20 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
25 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit
30 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
35 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ

niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x
5 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit
Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%
Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride
sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
10 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und
gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's
Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,
Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
15 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x
SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der
Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von
50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert
20 werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens
80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 99%
Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Es
ist ebenfalls möglich Polynukleotidfragmente zu isolieren,
die eine vollständige Identität zur Sequenz der
25 eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur
Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt
erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche
Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No.
1603558).
- 30 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann
unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide
synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,
1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer
35 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des otsA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

5 Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des otsA-Gens oder die katalytischen/regulatorischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

10 Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und
15 Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191
20 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
25 Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind
30 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus
35 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen

Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und

5 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von

10 der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu

15 Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung

20 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und

25 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology

30 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen

35 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise

E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation

in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

10 In das *otsA*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *otsA*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene oder Allele erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Abschwächung des *otsA*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- 5 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 15 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE 20 (DE-A-195 48 222),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin
- 25 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des otsA-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113),
- 10 • das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen *fda* (Accession No. X17313; von der Osten et al., Molecular Microbiology 3 (11), 1625-1637 (1989)),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A-0131171),
- 15 • das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen *thrB* (Peoples, O.W., et al., Molecular Microbiology 2 (1988): 63 - 72) und
- das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen *panD* (EP-A-1006192) und

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 20 Die Abschwächung der Homoserin-Dehydrogenase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Valin gegen L-Alanin, L-Glycin oder L-Leucin an Position 59 des Enzymproteins, durch den Austausch von L-Valin gegen L-Isoleucin, L-Valin oder L-
- 25 Leucin an Position 104 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Asparagin gegen L-Threonin oder L-Serin an Position 118 des Enzymproteins erreicht werden.

- Die Abschwächung der Homoserin-Kinase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch
- 30 den Austausch von L-Alanin gegen L-Valin, L-Glycin oder L-

Leucin an Position 133 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Prolin gegen L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Serin an Position 138 des Enzymproteins erreicht werden.

5 Die Abschwächung der Aspartat-Decarboxylase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch die Austausche L-Alanin gegen L-Glycin, L-Valin oder L-Isoleucin an Position 36 des Enzymproteins erreicht werden.

10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *otsA*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
20 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und
25 periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, 5 Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

10 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und 15 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. 20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen 25 eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

30 Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können 35 Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester

eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wird wie bei
5 Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham
Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-
Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche
10 Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of
Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe
des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla,
30 USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract,
Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) werden die Zellen in
10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens otsA

10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach
20 gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
25 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al.
30 (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird anschließend in den E. coli Stamm DH5αMCR (Grant, 1990,

Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

- 5 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-
10 5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der
15 Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).
- 20 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate werden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
25 Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein offenes Leseraster von 1485 bp, welches als otsA-Gen
30 bezeichnet wird. Das otsA-Gen kodiert für ein Polypeptid von 485 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <110> Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 010037 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 3010

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (884)..(2338)

<223> otsA-Gen

25

<400> 1

attgcggggc ttactgcgct gatgggttct gcgttttatt acctcttcgt tgtttattta 60

ggccccgtct ctgccgctgc gattgctgca acagcagttg gtttcactgg tgggtttgctt 120

30

gcccgctgat tcttgattcc accgttgatt gtggcgattg ccggcatcac accaatgctt 180

ccaggtctag caatttaccg cggaatgtac gccaccctga atgatcaaac actcatgggt 240

35

ttcaccaaca ttgcggttgc tttagccact gttcatcac ttgccgctgg cgtgggttttg 300

ggtgagtgga ttgccgcgag gctacgtcgt ccaccacgct tcaaccata cegtgcattt 360

accaaggcga atgagttctc cttccaggag gaagctgagc agaatcagcg ccggcagaga 420

40

aaacgtccaa agactaatca gagattcggc aataaaaaggc aaaaatcaac ctgcttaggc 480

gtctttcgtc taaatagcgt agaatatcgg gtcgatcgtc tttaaact caggaggatc 540

45

cttgccggcc aaaatcacgg aactcgtcc caccacagaa tcccttcacg ctggtgaaga 600

ggaaaccgca gccggtgcc gcaggattgt tgccacctat tctaaggact tcttcgacgg 660

cgtcactttg atgtgcatgc tcggcggttg acctcagggc ctgcgttaca ccaaggctgc 720

50

ttctgaacac gaggaagctc agccaaagaa ggctacaaag cggactcgta aggcaccagc 780

taagaaggct gctgctaaga aaacgaccaa gaagaccact aagaaaacta ctaaaaagac 840

55

caccgcaaag aagaccacaa agaagtctta agccgatct tat atg gat gat tcc 895

Met Asp Asp Ser

	aat	agc	ttt	gta	gtt	gtt	gct	aac	cgt	ctg	cca	gtg	gat	atg	act	gtc	943
	Asn	Ser	Phe	Val	Val	Val	Ala	Asn	Arg	Leu	Pro	Val	Asp	Met	Thr	Val	
	5					10					15					20	
5	cac	cca	gat	ggg	agc	tat	agc	atc	tcc	ccc	agg	ccc	ggg	ggc	ctt	gtc	991
	His	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Val	
					25					30					35		
10	acg	ggg	ctt	tcc	ccc	gtt	ctg	gaa	caa	cat	cgt	gga	tgt	tgg	gtc	gga	1039
	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Val	Leu	Glu	Gln	His	Arg	Gly	Cys	Trp	Val	Gly	
				40					45					50			
15	tgg	cct	gga	act	gta	gat	gtt	gca	ccc	gaa	cca	ttt	cga	aca	gat	acg	1087
	Trp	Pro	Gly	Thr	Val	Asp	Val	Ala	Pro	Glu	Pro	Phe	Arg	Thr	Asp	Thr	
			55					60					65				
20	ggg	gtt	tgg	ctg	cac	cct	gtt	gtc	ctc	act	gca	agt	gac	tat	gaa	ggc	1135
	Gly	Val	Leu	Leu	His	Pro	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Ser	Asp	Tyr	Glu	Gly	
		70					75					80					
25	ttc	tac	gag	ggc	ttt	tca	aac	gca	acg	ctg	tgg	cct	ctt	ttc	cac	gat	1183
	Phe	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Phe	His	Asp	
	85					90					95					100	
30	ctg	att	gtt	act	ccg	gtg	tac	aac	acc	gat	tgg	tgg	cat	gcg	ttt	cgg	1231
	Leu	Ile	Val	Thr	Pro	Val	Tyr	Asn	Thr	Asp	Trp	Trp	His	Ala	Phe	Arg	
					105					110					115		
35	gag	gta	aac	ctc	aag	ttc	gct	gaa	gcc	gtg	agc	caa	gtg	gcg	gca	cac	1279
	Glu	Val	Asn	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Ala	Ala	His	
				120					125					130			
40	ggg	gcc	act	gtg	tgg	gtg	cag	gac	tat	cag	ctg	ttg	ctg	gtt	cct	ggc	1327
	Gly	Ala	Thr	Val	Trp	Val	Gln	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Leu	Val	Pro	Gly	
			135					140					145				
45	att	ttg	cgc	cag	atg	cgc	cct	gat	ttg	aag	atc	ggg	ttc	ttc	ctc	cac	1375
	Ile	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Pro	Asp	Leu	Lys	Ile	Gly	Phe	Phe	Leu	His	
		150					155					160					
50	att	ccc	ttc	cct	tcc	cct	gat	ctg	ttc	cgt	cag	ctg	ccg	tgg	cgt	gaa	1423
	Ile	Pro	Phe	Pro	Ser	Pro	Asp	Leu	Phe	Arg	Gln	Leu	Pro	Trp	Arg	Glu	
	165					170				175						180	
55	gag	att	gtt	cga	ggc	atg	ctg	ggc	gca	gat	ttg	gtg	gga	ttc	cat	ttg	1471
	Glu	Ile	Val	Arg	Gly	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Phe	His	Leu	
					185				190						195		
60	gtt	caa	aac	gca	gaa	aac	ttc	ctt	gcg	tta	acc	cag	cag	gtt	gcc	ggc	1519
	Val	Gln	Asn	Ala	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Gln	Gln	Val	Ala	Gly	
				200					205					210			
65	act	gcc	ggg	tct	cat	gtg	ggg	cag	ccg	gac	acc	ttg	cag	gtc	agt	ggg	1567
	Thr	Ala	Gly	Ser	His	Val	Gly	Gln	Pro	Asp	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Gly	
			215					220					225				
70	gaa	gca	ttg	gtg	cgt	gag	att	ggc	gct	cat	gtt	gaa	acc	gct	gac	gga	1615
	Glu	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Val	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	
		230					235					240					

	agg cga gtt agc gtc ggg gcg ttc ccg atc tcg att gat gtt gaa atg	1663
	Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile Asp Val Glu Met	
	245 250 255 260	
5	ttt ggg gag gcg tcg aaa agc gcc gtt ctt gat ctt tta aaa acg ctc	1711
	Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu Leu Lys Thr Leu	
	265 270 275	
10	gac gag ccg gaa acc gta ttc ctg gcc gtt gac cga ctg gac tac acc	1759
	Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Thr	
	280 285 290	
15	aag ggc att ttg cag cgc ctg ctt gcg ttt gag gaa ctg ctg gaa tcc	1807
	Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu Leu Leu Glu Ser	
	295 300 305	
20	ggc gcg ttg gag gcc gac aaa gct gtg ttg ctg cag gtc gcg acg cct	1855
	Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln Val Ala Thr Pro	
	310 315 320	
25	tcg cgt gag cgc att gat cac tat cgt gtg tcg cgt tcg cag gtc gag	1903
	Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg Ser Gln Val Glu	
	325 330 335 340	
30	gaa gcc gtc gcc cgt atc aat ggt cgt ttc ggt cgc atg ggg cgt ccc	1951
	Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg Met Gly Arg Pro	
	345 350 355	
35	gtg gtg cat tat cta cac agg tca ttg agc aaa aat gat ctc cag gtg	1999
	Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn Asp Leu Gln Val	
	360 365 370	
40	ctg tat acc gca gcc gat gtc atg ctg gtt acg cct ttt aaa gac ggt	2047
	Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro Phe Lys Asp Gly	
	375 380 385	
45	atg aac ttg gtg gct aaa gaa ttc gtg gcc aac cac cgc gac ggc act	2095
	Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His Arg Asp Gly Thr	
	390 395 400	
50	ggt gct ttg gtg ctg tcc gaa ttt gcc gcc gcg gcc act gag ctg acc	2143
	Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala Thr Glu Leu Thr	
	405 410 415 420	
55	ggt gcg tat tta tgc aac cca ttt gat gtg gaa tcc atc aaa cgg caa	2191
	Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser Ile Lys Arg Gln	
	425 430 435	
60	atg gtg gca gct gtc cat gat ttg aag cac aat ccg gaa tct gcg gca	2239
	Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro Glu Ser Ala Ala	
	440 445 450	
65	acg cga atg aaa acg aac agc gag cag gtc tat acc cac gac gtc aac	2287
	Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr His Asp Val Asn	
	455 460 465	

gtg tgg gct aat agt ttc ctg gat tgt ttg gca cag tgg gga gaa aac 2335
 Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln Ser Gly Glu Asn
 470 475 480

5 tca tgaacgcgcg acgaatcgcg accataggcg ttcttccgct tgctttactg 2388
 Ser
 485

10 ctggcgctct gtgggttcaga caccgtggaa atgacagatt ccacctgggt ggtgaaccaat 2448
 atttacacgg atccagatga gtogaattcg atcagtaato ttgtcatttc ccagcccagc 2508
 ttagattttg gcaattcttc cctgtctggt ttcactggct gtgtgccttt taaggggcgt 2568

15 ggggaattct tccaaaatgg tgagcaaagc tctgttctgq atcccgatta tgtgaccttg 2628
 tcttccctgg atttcgataa acttcccgat gattgccaag gacaagaact caaagttoat 2688
 aacgagctgg ttgatcttct gcttggttct ttgaaatct ccaggacttc tgggttcagaa 2748

20 atcttgotga ctacgatgt cgatgaactc gatcgccag caatccgctt ggtgtcctgg 2808
 atcgcgccga catcttaagg tgccagggtt ttaaagtgcc aggggtttctg tgggatccgt 2868
 25 aactgggttc ccatgacttt gactattgag gaaatcgcca agaccaaaaa gcttttggtt 2928
 gtgtccgatt ttgatggaac catcgcagga ttagcaagg acgcttacaa cgttccctatc 2988
 aaccagaaat cctcaaggc gg 3010

30
 <210> 2
 <211> 485
 <212> PRT
 35 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val
 1 5 10 15

40 Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro
 20 25 30

45 Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly
 35 40 45

Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe
 50 55 60

50 Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro
 85 90 95

55 Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp
 100 105 110

		His	Ala	Phe	Arg	Glu	Val	Asn	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Gln
				115					120					125			
5		Val	Ala	Ala	His	Gly	Ala	Thr	Val	Trp	Val	Gln	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu
			130					135					140				
		Leu	Val	Pro	Gly	Ile	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Pro	Asp	Leu	Lys	Ile	Gly
			145				150					155					160
10		Phe	Phe	Leu	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Ser	Pro	Asp	Leu	Phe	Arg	Gln	Leu
					165						170					175	
		Pro	Trp	Arg	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Gly	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val
					180					185					190		
15		Gly	Phe	His	Leu	Val	Gln	Asn	Ala	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Gln
				195					200					205			
		Gln	Val	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	His	Val	Gly	Gln	Pro	Asp	Thr	Leu
			210					215					220				
		Gln	Val	Ser	Gly	Glu	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Val	Glu
			225				230					235					240
25		Thr	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Val	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Pro	Ile	Ser	Ile
					245						250					255	
		Asp	Val	Glu	Met	Phe	Gly	Glu	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Leu	Asp	Leu
					260					265					270		
30		Leu	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Pro	Glu	Thr	Val	Phe	Leu	Gly	Val	Asp	Arg
				275					280					285			
		Leu	Asp	Tyr	Thr	Lys	Gly	Ile	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Phe	Glu	Glu
			290					295					300				
		Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Gln
							310					315					320
40		Val	Ala	Thr	Pro	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Asp	His	Tyr	Arg	Val	Ser	Arg
					325						330					335	
		Ser	Gln	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Phe	Gly	Arg
					340					345					350		
45		Met	Gly	Arg	Pro	Val	Val	His	Tyr	Leu	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Lys	Asn
				355					360					365			
		Asp	Leu	Gln	Val	Leu	Tyr	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Leu	Val	Thr	Pro
			370					375					380				
		Phe	Lys	Asp	Gly	Met	Asn	Leu	Val	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Ala	Asn	His
							390					395					400
55		Arg	Asp	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Glu	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala
						405					410					415	
		Thr	Glu	Leu	Thr	Gly	Ala	Tyr	Leu	Cys	Asn	Pro	Phe	Asp	Val	Glu	Ser
					420					425					430		

Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro
435 440 445

5 Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr
450 455 460

His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln
465 470 475 480

10 Ser Gly Glu Asn Ser
485

15

010037 BT

30

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,
- 15 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
- 20 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - 25 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

010037 BT

31

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC
durchgeführt wird.
- 10 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das otsA-Gen
abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
- 15 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
durchführt:
- 20 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das otsA-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere
ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien, und
- 25 c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
30 verstärkt.

010037 BT

32

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das otsA-Gen
kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere
ausschaltet.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen (bzw. katalytischen) Eigenschaften des
Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das
Polynukleotid otsA kodiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 14.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 14.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 14.3 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 14.4 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 14.5 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende
Gen pgk,
- 14.6 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,

010037 BT

33

- 14.7 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen *pyc*,
- 14.8 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo*,
- 5 14.9 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 14.10 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 14.11 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1*
- 10 verstärkt bzw. überexprimiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
- 15 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 20 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*,
- 15.5 das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen *fda*,
- 25 15.6 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom*,
- 15.7 das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen *thrB*,

010037 BT

34

15.8 das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen *panD*

abschwächt.

- 5 16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz, trägt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 15 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *otsA*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden einsetzt.
- 20 19. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.